

DARSTELLUNG DES
GESAMTEN SPEKTRUMS DER
HUMANPLASMALIPOPROTEINE
DURCH PRÄZIPITATION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

MANUEL GARCÍA PARRA
aus Venezuela

Marburg/Lahn 1976

Druck: Mauersberger, Marburg

**DARSTELLUNG DES
GESAMTEN SPEKTRUMS DER
HUMANPLASMALIPOPROTEINE
DURCH PRÄZIPITATION**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)**

**eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

von

MANUEL GARCÍA PARRA

aus Venezuela

Marburg/Lahn 1976

Druck: Mauersberger, Marburg



Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg/Lahn

als Dissertation angenommen am: 30.11.1976

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.1976

Berichterstatter: Prof. Dr. P. Karlson

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Kindl

Die vorliegende Arbeit entstand am
Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität in Marburg
unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Karlson

dem mein Dank für seine Betreuung gilt.

Ebenfalls danke ich Herrn Dozent

Dr. G. Kostner

von der Universität Graz (Austria)
für die erhaltene Unterstützung.

Für die Förderung dieser Arbeit
sowie für die finanzielle Hilfe
danke ich der

Consejo Nacional de Investi-
gaciones Cientificas y Tecno-
logicas de Venezuela

Meiner Mutter und
meiner Schwester
in Dankbarkeit und
Verehrung

Inhaltverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Problemstellung	15
3. Material und Methoden	19
3.1. Material	19
3.2. Methoden	21
3.3. Experimenteller Teil	24
4. Ergebnisse	31
4.1. Untersuchungen der mit Ammoniumsulfatfällung erhaltenen Fraktionen	33
4.2. Darstellung der Lipoproteine durch Phosphorwolframat und ihre Charakterisierung	41
4.2.1. LDL-Darstellung und -Charakterisierung	42
4.2.2. Lp(a)-Darstellung und -Charakterisierung	48
4.2.3. HDL-Darstellung und Charakterisierung	55
4.2.4. VLDL - LDL ₁ -Darstellung und -Charakterisierung	58
4.3. Untersuchung über das Vorkommen von Lipoproteinen in atherosklerotischen Plaques	61
5. Diskussion	65
6. Zusammenfassung	75
7. Literaturverzeichnis	76
8. Verzeichnis der Abkürzungen	82

I. Einleitung

Die ihrer Natur nach wasserunlöslichen Lipide werden im Blut nur durch bestimmte Proteine zum Transport befähigt. Blutlipide liegen demnach als Lipoproteine vor.

Die Plasma lipoproteine sind makromolekulare komplexe, die aus spezifischen Lipiden und Proteinen in bestimmten Verhältnissen bestehen. Alle Lipide des Plasmas, -hauptsächlich Glyceride, Phospholipide, Cholesterin und Cholesterinester-, kommen in allen Serumlipoproteinklassen vor (1) (s. Tabelle I). Auch Kohlenhydrate findet man in einigen Serumlipoproteinen in geringer Menge (2).

Die Zusammensetzung der Lipoproteine aus Lipiden und spezifischen Proteinen bestimmt ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften wie Molekülgröße, Dichte, elektrische Ladung, Affinität und Wechselwirkung sowohl untereinander (3, 4) als auch zu anderen Molekülen (5, 6) und zu Zellmembranen (7, 8).

Diese Eigenschaften der Lipoproteine gestatten eine Differenzierung in verschiedene Fraktionen mit Hilfe der Elektrophorese (9, 10), Ultrazentrifuge (11, 12) und durch immunologische Methoden (13). Die Nomenklatur und allgemeine Eigenschaften der Plasmalipoproteine sind in Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle I

Lipidzusammensetzung der menschlichen Lipoproteine

Zusammensetzung %	Chylomikronen	VLDL	LDL	HDL
P-Lipide	7	18	22	24
Cholesterin	2	7	8	2
Cholesterinester	5	12	37	20
Triglyceride	84	54	11	4

Ref. aus Lit. 14. 15.

Erklärung der Abkürzungen s. Seite 75.

Tabelle II

Allgemeine Eigenschaften der menschlichen Serumlipoproteine

Parameter	Chylomikro- nen	VLDL	LDL ₁	LDL ₂	HDL ₂	HDL ₃
Elektrophoretische Beweglichkeit (Papier, Agarose)	Start	Prä-β	β (?)	β	α	α
Dichteklase (g/ml)	0,94	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,125	1,125-1,210
Sf-Wert	400	20-400	12-20	0-12	3,6-9	0-3,5
Molekulargewicht	0,4x10 ⁹	5x10 ⁶	3,9-4,8x10 ⁶	2,75x10 ⁶	0,2-0,4x10 ⁶	0,175x10 ⁶
Durchmesser (nm)	70	25-70	22-24	19,6-22,7	7-10	4-7

Sf = Flotationsrate im Zentrifugalfeld in NaCl ($d = 1,063$ g/ml) bei 26°C. Die Rate wird in Svedberg-Einheiten ausgedrückt wie die üblichen Sedimentationskoeffizienten, jedoch sind die Werte nicht reduziert auf H₂O und das negative Vorzeichen ist weggelassen. Ref. aus Lit.1,70.

Die Entwicklung der Lipoproteinforschung ist stark von den gegebenen chemischen und physikalischen Methoden, die bei deren Untersuchung zur Anwendung kamen, geprägt und beeinflusst worden.

Die erste Isolierung eines Lipoprotein-Komplexes mit konstanter Zusammensetzung gelang Macheboeuf (16) bereits 1929. In der Elektrophorese wanderte dieses Lipoprotein wie ein α -Globulin.

Etwas später zeigten Blix, Tiselius und Svensson (17) daß der größte Teil der Plasmalipide elektrophoretisch entweder mit der α - oder der β -Globulinfraction wandert. Damit wurde eine erste Einteilung der Lipoproteine entsprechend ihrer elektrophoretischen Wanderung möglich.

Der nächste bedeutende Beitrag zur Lipoproteinforschung wurde von Pedersen (18, 19) geliefert. 1945 isolierte er mittels Ultrazentrifugation aus Menschenserum eine lipidreiche Fraktion der Dichte 1,03 g/ml und zeigte ein Lipoprotein in der Größenordnung von 10^6 Daltons. Diese Untersuchung bezeichnet den An-

fang einer neuen Phase der Lipoproteinforschung, die durch die Entwicklung von Ultrazentrifugentechniken für die analytische Untersuchung und präparative Darstellung der Serumlipoproteine charakterisiert ist.

Die Anwendung und Entwicklung dieser Methoden durch Gofman et al. (20, 21) zeigte, daß die Plasmalipoproteine ein breites Spektrum von Partikeln unterschiedlicher Größe und hydratisierten Dichte darstellen.

Diese Ergebnisse führten zu einer neuen klassifizierung (22) der Serumlipoproteine. Hiernach unterscheidet man: 1. Chylomikronen; 2. Lipoproteine sehr geringer Dichte, engl. very low density lipoproteins = VLDL; 3. Lipoproteine geringer Dichte, low density lipoproteins = LDL; und 4. Lipoproteine höherer Dichte, high density lipoproteins = HDL, (s. Tabelle II).

Bei der Papier- und Agarosegelelektrophorese der Plasmaproteine findet man ebenfalls 4 Lipoproteinfraktionen.

Eine Lipoproteinfraktion wandert mit den α -Globuli-

nen (α -Lipoproteine), eine mit den β -Globulinen (β -Lipoproteine), eine weitere zeigt sich knapp vor den β -Globulinen (Prä- β -Lipoproteine) und noch eine weitere Fraktion, die Chylomikronen, verbleibt am Startpunkt der Trennung.

Ein Vergleich dieser Fraktionen mit denen, die im Dichtegradienten mit der Ultrazentrifuge erhalten werden, zeigt, daß die α -Lipoproteine den HDL, die β -Lipoproteine den LDL und die Prä- β -Lipoproteine den VLDL entsprechen. Die am Startpunkt verbleibende Fraktion ist mit den Chylomikronen identisch.

Untersuchungen in den letzten Jahren (23, 24) haben gezeigt, daß am Aufbau der Plasmalipoproteine mindestens 3 verschiedenen Gruppen von Polypeptiden beteiligt sind. Diese Polypeptide werden als Apoproteine bezeichnet und sind nach Alaupovic (25) in drei Hauptfamilien eingeteilt: Lipoprotein-A, Lipoprotein-B, und Lipoprotein-C, mit den spezifischen Polypeptide A, B, und C. Lipoproteinfraktionen, die

durch Ultrazentrifugation oder andere Techniken isoliert werden, stellen Aggregate dieser Familien dar (s. Tabelle III).

Tabelle III

Apoproteinzusammensetzung der menschlichen Lipoproteine

Protein %	Chylomikronen	VLDL	LDL	HDL
B	+	40	100	-
A-I	-	+	-	65
A-II	-	+	-	25
A-III	-	-	-	+
C	+	58	-	5

Ref. aus Lit. 28, 29, 30.

Apoprotein A hat zwei nicht-identische Polypeptidketten A-I und A-II, die an ihren C-terminalen Ende jeweils die Aminosäure Glutamin tragen (29, 30).

Die Molekulargewichte betragen 25000 Daltons für Apoprotein A-I bzw. 17000 Daltons für A-II (31, 32, 33). Apoprotein A ist sowohl in VLDL und LDL₁ als auch in HDL enthalten und steht in einem Austausch (34, 35) zwischen VLDL und HDL.

Apoprotein B ist nur aus einem einzigen Polypeptid aufgebaut, dessen Struktur noch nicht völlig aufgeklärt ist. Am C-terminalen Ende wurde die Aminosäure Serin, am N-terminalen Ende Glutaminsäure identifiziert (36). Apoprotein B besitzt Kohlenhydrate folgender Zusammensetzung : 2,7% Hexose, 0,3% Fucose, 1,2% Glucosamine und 1.4% Neuraminsäure (37). Dieses Apoprotein ist sowohl in den VLDL, LDL₁, LDL₂, als auch in einem aus dem VLDL hervorgehenden Zwischenprodukt enthalten (38, 39).

Apoprotein C besteht aus drei Komponenten, die sich in ihrer Größe, ihrem Aminosäurenmustern und ihren

immunologischen Eigenschaften unterscheiden (40, 41). Dieses Apoprotein ist sowohl in der VLDL, HDL, LDL₁ als auch in einem aus den VLDL hervorgehenden Zwischenprodukt -dem sogenannten "Intermediate"- enthalten. Es steht auch in einem Austausch zwischen VLDL und HDL (34, 35).

Alle Einteilungen der Serumlipoproteine sind auf sog. "Normal-Seren" bezogen worden. Man kann jedoch häufig Schwankungen beobachten. Diese Schwankungen treten z.B. bei Individuen unterschiedlichen Geschlechts, bei Stoffwechselstörungen und bei genetischen Unterschieden in der Zusammensetzung der Lipoproteine auf. Einige Defekt-Lipoproteinämien, wie z.B. Abeta-Lipoproteinämie, Tangier-Krankheit, beruhen auf genetischen Störungen (42). Andere Veränderungen des normalen Lipoproteinmusters werden durch bestimmte Krankheiten (Leberschäden) hervorgerufen (43).

Bei menschlichen Lipoproteinen sind verschiedene genetische Varianten gefunden worden. Eine der am besten untersuchten Varianten ist ein Polymorphismus der LDL, das Lp(a)-Lipoprotein.

Diese genetische determinierte Variante läßt sich ebenso bei klinisch gesunden Personen wie bei Patienten nachweisen.

Berg (44) bezeichnete dieses "Erbmerkmal" als Lp(a)-Lipoprotein und berechnete seine Häufigkeit auf 34% der (männlichen norwegischen) Bevölkerung (45).

Das Lp(a)-Lipoprotein wurde ursprünglich als qualitatives Merkmal betrachtet (44). Mit Hilfe der Immundiffusion im Ouchterlony Test (67) wurde die Bevölkerung in Lp(a) positiv (+) bzw. Lp(a) negativ (-) eingeteilt (45).

Neuere Untersuchungen (46, 47, 48) haben im Gegensatz dazu gezeigt, daß es quantitative Schwankungen des Lp(a)-Antigens sind, die einer genetischer Steuerung unterliegen. Die Einteilung der Bevölkerung in Lp(a)

positiv (+) bzw. Lp(a) negativ (-) ist nicht gerechtfertigt. Die enormen quantitativen Unterschiede zwischen den Lp(a)-Lipoproteinkonzentrationen verschiedener Spender zeigt die Untersuchung von Ehnholm et al. (49), die in Seren von Lp(a)(+)-Spendern mit Hilfe der radialen Immundiffusion Werte zwischen 2,8 mg und 84 mg Lp(a)-Lipoprotein pro 100 ml Serum fanden.

Das Lp(a)-Lipoprotein läßt sich in den üblichen Klassifizierungsrahmen der Lipoproteinfraktionen des Plasmas nicht einordnen.

Während es auf Grund ~~seines~~ Verhaltens bei der Ultrazentrifugation sowohl dem LDL- als auch dem HDL-Bereich angehört (50, 51), besitzt es eine elektrophoretische Beweglichkeit, die der des VLDL entspricht (52,53). Dieser Umstand erschwert besonders seine Trennung von anderen Lipoproteinen und hier ist eine Kombination von mehreren Methoden unerlässlich.

Tabelle IV

Vergleich der Eigenschaften des Lp(a)-Lipoproteins mit
anderen Lipoproteinen

	Lp(a)-Lipoprotein	LDL ₂	HDL ₁
Dichte (g/ml)	1,05-1,125	1,019-1,063	1,063- 1,125
Lipid:Protein(mg/mg)	1,8	3,75	1,5
Molekulargewicht	5 x 10 ⁶	2,75x10 ⁶	0,2-0,4x10 ⁶
isoelektrischer Punkt	4,9	5,5	heterogen
elektrophoretische Mobilität:			
a) Agarose	Prä-β	β	α
b) Polyacrylamidgel(3,75%)	sehr langsam	langsam	schnell
Proteinanteil	Apo-B	Apo-B	Apo-A
	Lp(a)-Protein		Apo-C
	Albumin		
Durchmesser im Elektronen-			
mikroskop	255 A	196-227 A	70-100 A
Reaktion mit Anti-LDL	+	+	-
" " " -Lp(a)	+	-	-
" " " -HDL	-	-	-

Das Lp(a)-Lipoprotein ähnelt in einigen Eigenschaften dem LDL₂. Es unterscheidet sich aber in einer Reihe anderer. So ist zum Beispiel der Lipidgehalt des Lp(a)-Lipoproteins relativ geringer als der des LDL₂ (49, 54)(s. Tabelle IV).

Ehnholm et al. (55) sowie Utermann et al. (56) fanden, daß das Lp(a)-Lipoprotein sich aus drei unterschiedlichen molekularen Bausteinen aufbaut, die als LDL, Albumin und sogenanntes Lp(a)-Antigen identifiziert wurden.

Seidel et al. (57) fanden Apoprotein C in ihren Lp(a)-Lipoproteinfraktionen. Bei der Isolierung und partiellen Charakterisierung des Lp(a)-Antigens konnten Kostner et al. (58) weder Apoprotein C noch Albumin, sondern ein anderes Apoprotein, nämlich das Apoprotein D, nachweisen.

Die Existenz des Lp(a)-Antigens ist bisher nur im spezifischen Komplex nachgewiesen worden. Ob es sich

um einem "Funktionellen" Komplex handelt oder ob das Lp(a)-Antigen im Plasma nur mit dem LDL transportiert wird, ist heute noch nicht bekannt.

Verschiedene Autoren vermuten, daß ein Zusammenhang zwischen dem Lp(a)-Lipoprotein und dem Auftreten von Hyperlipoproteinämien (68) und Atherosklerose (69) besteht.

Die Schwierigkeiten der Isolierung, die niedrige Ausbeute (55) sowie die geringe Stabilität des Komplexes (56) komplizieren das Studium dieses Moleküls.

II. Problemstellung

Eine Erfassung sämtlicher Lipoproteine eines Serums ist mit keiner der bisher bekannten Methoden der Lipoproteindarstellung allein möglich.

Die Ultrazentrifugation ist auch heute noch die Methode der Lipoproteinisolierung, die am weitesten verbreitet ist. Es existiert nämlich derzeit keine Methode, mit der es gelingt, relativ große Mengen Lipoproteine zu gewinnen, die frei von anderen Plasmaproteinen sind.

Außer den hohen Anschaffungs- und Betriebskosten einer Ultrazentrifuge besitzt die Methode selbst einige Nachteile.

Um Plasmaproteine in die üblichen Dichteklassen VLDL, LDL und HDL zu fraktionieren und sie anschließend durch wiederholtes Waschen zu reinigen, bedarf es immerhin einer Laufzeit von mehr als 150 Stunden.

Dabei muß man mit einem beträchtlichen Verlust an Lipoproteinen rechnen. Ultrazentrifugation führt häufig zu nicht homogenen Präparationen und die Bildung von Artefakten ist dabei nicht ausgeschlossen (59).

Eine Isolierung des Lp(a)-Lipoproteins ist mit dieser Methode überhaupt nicht zu erreichen, da dieses Lipoprotein in einem Dichtebereich flotiert der sich vom LDL-Bereich bis in den HDL-Bereich hinein erstreckt.

Methoden zur Isolierung von Plasmalipoproteinen unter Umgehung der präparativen Ultrazentrifuge sind in der Literatur zahlreich beschrieben worden. Polyanionen wie Heparin (60), Dextransulfat verschiedenen Polymerisationsgrades (61, 62) Natriumdodecylsulfat (63) und Natriumphosphorwolframat (64) dienten dabei als Fällungsmittel zur Fraktionierung

von Lipoproteinen.

Obwohl eine vollständige Trennung der Plasmalipoproteine von Begleitproteinen des Serums durch die verschiedenen Fällungsmethoden kaum erreicht wird, haben sie sich doch als sehr nützlich bei der Untersuchung von Lipoproteinen erwiesen. Es gelingt damit vor allem, aus großen Volumina Lipoproteine in eine Reinheit von 95% zu fällen. Aus diesem Grund ermöglichen solche Fällungsmethoden in der klinischen Anwendung die Bestimmung der Verteilung von Cholesterin und anderen Lipiden in den verschiedenen Lipoproteinfraktionen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß diese Verteilung nur grob zu betrachten ist, da diese Fällungsmethoden nicht eine Trennung aller Lipoprotein-B enthaltenden Lipoproteinklassen (VLDL, LDL₁, LDL₂, Lp(a)) voneinander gestatten. So kann man nach Burstein (65) mit Heparin, Dextransulfat oder Natriumphosphorwolframat VLDL von

LDL₂ trennen, jedoch nicht LDL₁ und Lp(a).

Ein zusätzlicher Nachteil bei der Verwendung von Heparin und Dextransulfat (aber nicht von Phosphorwolframat) ist ferner, daß sie nach der Fällung nicht mehr quantitativ entfernt werden können und eine beträchtliche Veränderung der elektrophoretischen Mobilität der Lipoproteine verursachen (66).

Neue und bessere Methoden auf diesem Gebiet sind deshalb sehr wünschenswert.

Die vorliegende Arbeit beschreibt Versuche, eine Methode zur Trennung der Plasmalipoproteine zu entwickeln, die für die Forschung und für die Routine der klinisch-chemische Untersuchung geeignet ist.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Plasma-Material

Sowohl "out dated" als auch frisches Plasma wurde von der Marburger Blutbank erhalten.

Vor seiner Verwendung wurde zum Plasma EDTA, NaN_3 , und Merthiolate zugefügt.

Antiseren

Folgende monospezifische Antiseren: Anti- β , Anti-AI, Anti-AII, Anti-C, und Anti-Lp(a); wurden von Dr. G. Kostner von der Universität Graz erhalten.

Anti-Albumin stammt von den Behring-Werke A.G.

Atherosklerotische-Plaques

Diese wurden von Herrn G. Schmidt aus dem pathologischen Institut der Philipps-Universität erhalten.

Alle Fraktionen und Puffer enthalten ohne Ausnahme EDTA, Merthiolate, und NaN_3 in folgenden Konzentrationen:

EDTA 0,001 M

Merthiolate $5 \times 10^{-3} \%$

NaN_3 0,02 %

Puffer

Nr. 1 Na-Phosphat-Puffer 0,01 M pH 7,0

" 2 Tris/HCl " 0,05 M pH 7,7

" 3 " " 0,02 M 1 % NaCl pH 7,7

" 4 Barbiturat- " $\mu = 0,1$ pH 8,2

" 5 " " " " pH 8,6

" 6 Tris/HCl- " 0,1 M pH 9,0

" 7 " " 0,5 M pH 7,0

1 M NaCl

0,001 M MgCl_2

0,001 M CaCl_2

0,001 M MnCl_2

" 8 Wie Puffer Nr. 7 jedoch 0,4 an α -Methyl-Mannoside

Lösungen

- Lösung Nr. 1 0,1 M MgCl_2 , 1 % NaCl
- " " 2 10 % Natriumcitrat, 10 % Ammonium-
chlorid
- " " 3 0,2 M MgCl_2 , 1 % NaCl_2
- " " 4 Diese Lösungen enthalten 0,01 M Na-
Phosphat-Puffer pH 7,0; die jeweils
20%, 25%, 30%, ..., usw. bis 70% ge-
sättigt an Ammoniumsulfat sind.

Extraktionsmittel

- Nr. 1 0,01 M Na-Phosphat-Puffer pH 7,0
1 % NaCl
- Nr. 2 10 % Natriumbicarbonat

3.2. Methoden

a) Ultrazentrifugation

Die präparative Ultrazentrifugation wurde in einer

Ultrazentrifuge L 2-65 B der Firma Beckman mit einem Rotor 60-Ti, bei 4°C ausgeführt.

Die Serumdichte wurde entsprechend der Methode von Havel et al. (71) eingestellt.

Jede Lipoproteinklasse wurde durch zweimalige Flo-tation gereinigt:

b) Disc-Elektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde mit einer Apparatur der Firma Shandon (London) durchgeführt. Entsprechend dem Gelsystem Nr. 4 von Maurer (72) wurden die 3,75 % Gelen bei einer Stromstärke von 2,5 mA/Gel elektropherographiert.

c) Vorfärbung der Lipoproteinproben

Vor der Elektrophorese wurden die Proben entsprechend der Methode von Mc Donald und Ribeiro (73) mit Sudan Schwarz gefärbt und 24 Std. inkubiert.

d) SDS-Elektrophorese erfolgte nach der Methode von Weber und Osborn (74). Die Proteine wurden mit

Comassie Blue R-250 gefärbt.

e) Agarose-Elektrophorese wurde nach der Methode von Noble (75) durchgeführt.

f) Doppel-Immundiffusion.

Die Durchführung erfolgte nach Ouchterlony (67) jedoch im Agarose-Gel bei pH 8,2.

g) Immunelektrophorese

Dieser Reinheitstest wurde sowohl gegen Anti-Human-Serum als auch gegen monospezifische Apoprotein-Antikörper nach der Methode von Scheidegger (76) durchgeführt.

h) Zwei-Dimensionale-Immunelektrophorese

Diese Bestimmung erfolgte nach der Methode von Laurell (77), modifiziert nach Clarke und Freman (78).

i) Elektronenmikroskopie

Die jeweiligen Aliquote wurden mit 2 % Phosphor-

wolframsäure pH 6,7 negativ kontrastiert und bei 80 KV und einer Vergrößerung von 39 900 untersucht (Simens Elmiskop I).

3.3. Experimenteller Teil

Ammoniumsulfatfällung

Die zu untersuchenden Fraktionen wurden nach Dialyse (Puffer Nr. 1) folgendermaßen behandelt:

Die Serumfraktionen wurden nach der Formel

$$y = \frac{x \cdot G \cdot (S_1 - S_2)}{1 - \frac{V \cdot G}{1000} S_2}$$

auf der entsprechenden Ammoniumsulfatsättigung eingestellt.

y ist die Menge (g) Ammoniumsulfat, die zu einem Volumen x* einer Lösung einer Sättigung S_1 zugegeben werden muß, um diese Lösung zu einer Sättigung S_2 zu bringen, wobei G Gramm Ammoniumsulfat einer 1000 ml gesättigten Lösung, und V das spezifisches Volumen dieser gesättigten Lösung darstellen.

Bei allen Versuchen wurden $V = 0,5309$ und $G = 520$

* Liter

aus der Literaturwerten (81) interpoliert.

Die Ammoniumsulfat zugabe wurde bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren durchgeführt.

Die resultierenden trüben Lösungen wurden zum Erreichen des Equilibriums bei 4°C 24 Std. stehen gelassen.

Die Trennung der Niederschläge erfolgte durch Zentrifugation bei 15 000 x g (10 min.) (Sorvall Modell RC-2, Rotor SS 34). Die Niederschläge wurden mit Lösung Nr. 4 der entsprechende Ammoniumsulfatsättigung durch zweimalige Homogenisierung und Zentrifugation gewaschen.

Die aus der Waschprozedur resultierenden Lösungen und die jeweiligen Überstände wurden vereinigt und nach dem Schema der Abb. 1b stufenweise weiter verarbeitet.

Die Niederschläge wurden in Puffer Nr. 7 aufgelöst und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die vollständige Salzentfernung durch die Dialyse wurde mit Hilfe von BaCl von BaCl₂ verfolgt.

Fällung durch Phosphorwolframat

a) Aufarbeitung der Lipoproteine im präparativen Maßstab

Die Fällung mit Phosphorwolframat wurde nach der Methode von Burstein et al (65) durchgeführt.

Alle Fraktionen, mit Ausnahme der HDL-Fraktion, wurden durch Zugabe einer 4 %igen Phosphorwolframat-Lösung, pH 7,7 (Endkonzentration 0,05%) und einer 2 M $MgCl_2$ -Lösung (Endkonzentration 0,1M) ausgefällt.

Bei der Reinigung der HDL-Fraktionen war die Endkonzentration 1 %ig an Phosphorwolframat und 0,2M an $MgCl_2$.

Alle Fällungen mit Phosphorwolframat wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die entstandene trübe Lösung wurde bei 15 000 x g (10 min. Sorvall s.o.) zentrifugiert.

Der resultierende Niederschlag wurde zweimal mit Lösung Nr. 4 gewaschen. Diese Prozedur erfolgte durch zweimalige Homogenisierung und Zentrifugation.

Der gewaschene Niederschlag wurde in 1 %iger NaCl-

Lösung suspendiert und durch Zugabe von 10 %igem Natriucitratlösung aufgelöst.

Sowohl der Niederschlag als auch der Überstand wurden gegen Lösung Nr. 2 24 Std. dialysiert und anschließend gegen Puffer Nr. 3 48 Std. dialysiert. Die Dialyse erfolgte bei 4°C.

b) Aufarbeitung der Lipoproteine im analytischen Maßstab

Die Fällung wurde wie bei dem präparativen Maßstab beschrieben durchgeführt.

Für die Fällung wurden 1.5 - 2 ml je Fraktion genommen. Sowohl die Fällung als auch die Trennung des Niederschlags erfolgte durch Zentrifugation im Eppendorf-Röhrchen.

Die Durchführung erfolgte wie bei dem präparativen Gang, jedoch wurde der Niederschlag in 200 µl Puffer Nr. 2 plus 50 µl 10 %igen Natriumbicarbonat aufgelöst. Es wurde keine Dialyse vorgenommen, und sowohl der ausgefällte Niederschlag als auch die Lösung aus dem Waschvorgang und der Überstand wurden direkt analysiert.

Gelfiltration

Zur Reinigung der verschiedenen Lipoproteinfraktionen wurden Gelfiltrationen auf Sepharose 4-B durchgeführt. Die Sepharose wurde vor Gebrauch in Startpuffer eingerührt und entgast.

Nach dem Einfüllen in die entsprechenden Säulen wurde bis zur Gelbettkonstanz mit Puffer gewaschen, dann wurde 2 x das Säulenvolumen mit dem entsprechenden Puffer eluiert.

Die Proteinlösung wurde vorsichtig aufgetragen und mit Startpuffer eluiert.

Der hydrostatische Druck betrug 40 cm und wurde konstant gehalten.

Affinitätschromatographie mit Con-A-Sepharose

Die Con-A-Sepharose wurde in Puffer Nr. 7 durch leichtes Rühren suspendiert und entlüftet.

Nach der Säuleneinfüllung wurde mit 1 Liter Puffer Nr. 7 gewaschen.

Dann wurde die Proteinlösung im Puffer Nr. 7 aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert.

Nach vollständiger Elution der nicht adsorbierten Proteine, wurde mit weiteren 1,5 Liter Puffer Nr. 7 eluiert.

Die Elution der an Con-A-Sepharose adsorbierten Proteine erfolgte mit Puffer Nr. 8.

Die Elution wurde bei 280 nm im Spektralphotometer (Zeiss PMQ II) verfolgt.

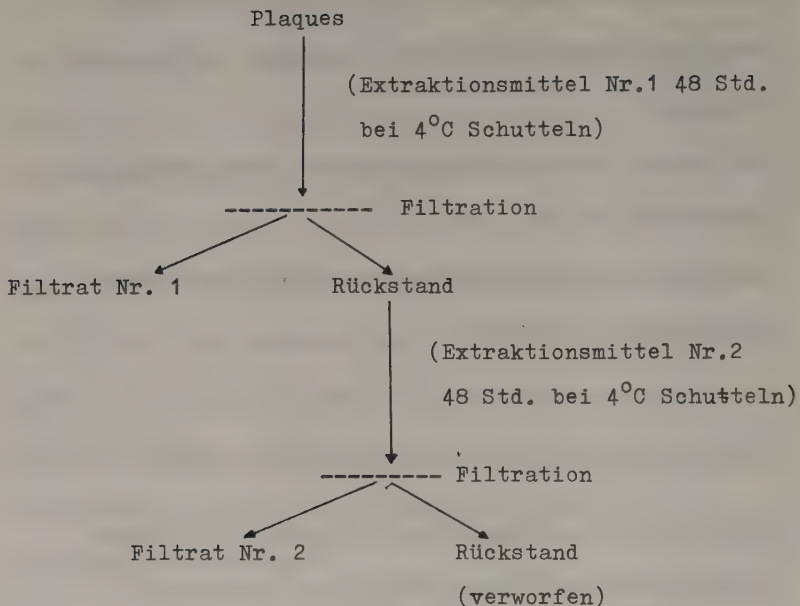
Vorbereitung der atherosklerotischen Plaques

Sklerotisiertes Material aus der Aorta wurde unter flissendem destillierten Wasser von Blutresten befreit.

Dann wurden die eigentlichen Plaques mit Hilfe eines Skalpellts entfernt. Je nach dem Versuch wurde entweder nur die Intima oder die Media verwendet.

Das Gewebe wurde mit Hilfe einer Schere in kleine Stücke geschnitten. Danach wurde das Material extrahiert.

Die erste Extraktion erfolgte unter ständigem Schütteln (48 Std.) bei 4°C nach folgendem Schema:



Die Extraktionsmittel sind im Abschnitt Material angegeben.

Nach der Extraktion wurde die trübe Suspension abfiltriert. Der Rückstand wurde weiter mit Extraktionsmittel Nr. 2 48 Std. bei 4°C extrahiert.

Das Filtrat wurde 10 min. bei 18 000 x g (Sorvall s.o.) abzentrifugiert.

4. Ergebnisse

Da das Vollserum zu viele verschiedene Lipoproteine enthält, mußten für die Festlegung der optimalen Fällungsbereiche Fraktionen herangezogen werden, die durch Fehlen bestimmter Lipoproteine gekennzeichnet waren. Auf diese Weise sollte erreicht werden, die mit der Ammoniumsulfatfällung zu ermittelnden Werte ganz bestimmten Lipoproteinen zuzuordnen.

Diese Fraktionen wurden mit der Ultrazentrifuge vorbereitet, wobei aus Vollserum die verschiedenen Lipoproteinklassen stufenweise herausflotiert wurden.

Dabei benutzte man folgende Fraktionen: (s. Abb. 1a)

Fraktion 1 Vollserum ohne Chylomikronen ($>0,94$ g/ml)

Fraktion 2 Vollserum ohne Chylomikronen und VLDL
($>1,006$ g/ml)

Fraktion 3 Vollserum ohne Chylomikronen, VLDL und
LDL₁ ($>1,010$ g/ml)

Fraktion 4 Vollserum ohne Chylomikronen, VLDL, LDL₁,
und LDL₂ ($>1,063$ g/ml)

Fraktion 5 Vollserum ohne Chylomikronen, VLDL, LDL₁,
LDL₂ und HDL₂ (>1.125 g/ml)

Diese Fraktionen wurden, wie in Abb. 1b angegeben, sequentiell mit Ammoniumsulfat ausgefällt und anschließend immunologisch untersucht.

Die in den Fraktionen 1 bis 5 fehlenden Lipoproteine wurden dem gleichen Fällungschema unterworfen und ebenfalls immunologisch untersucht.

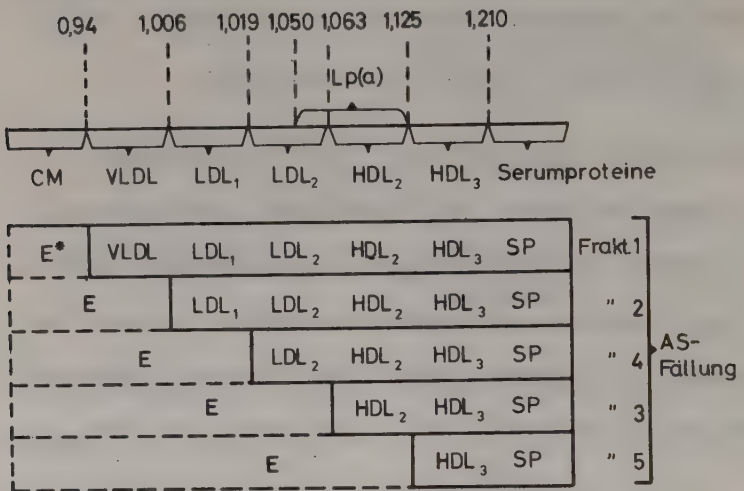


Abb. 1a Ultrazentrifugationschema der Fraktionen für die Ammoniumsulfatfällung
+ entfernt und aufbewahrt

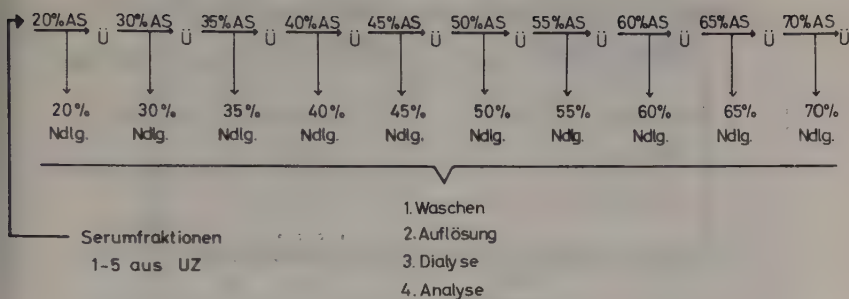


Abb. 1b Schema der Ammoniumsulfatfällung

4.1. Untersuchungen der mit Ammoniumsulfatfällung erhaltenen Fraktionen.

a) Immunologische Untersuchung

Das immunologische Spektrum und die Verteilung der A-, B-, C-Familien und Lp(a)-Antigenität zeigt Abb. 2

Immunologisches Spectrum und Verteilung der A-, B-, C-,
Apoproteinfamilien und Lp(a)-Antigenität von Lp(a)-Sera

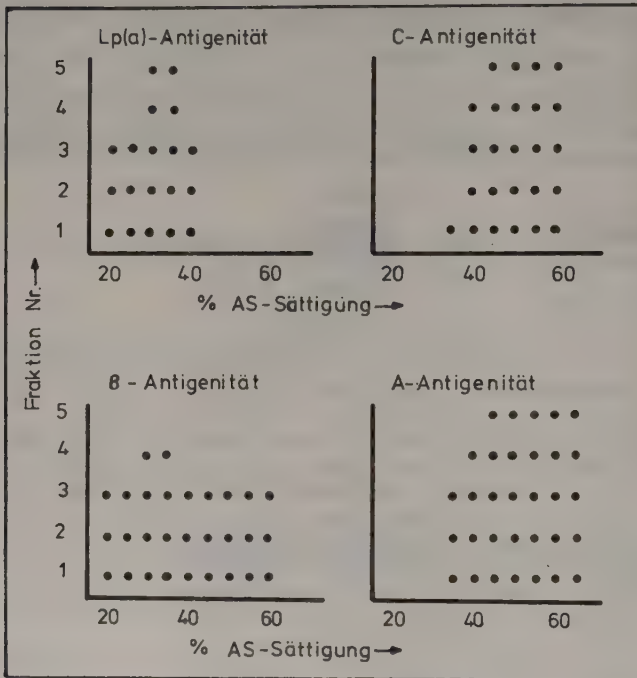


Abb. 2. Immunologisches Spektrum und Verteilung der A-, B-, C-Familien und Lp(a)-Antigenität bei Ammoniumsulfatfällung. Ordinaten: Die für die Ammoniumsulfatfällung vorbereiteten Fraktionen. Abzissen: Untersuchte Niederschläge nach entsprechenden Ammonium sulfatsättigungen (%).

Lp(a)-Antigenität:

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß die Fällungsbereiche der Lp(a)-Antigenität zwischen 20% und 40%

AS-Sättigung liegen. Während bei den Fraktionen 1, 2 und 3 die B-Antigenität noch bei 60% AS-Sättigung nachzuweisen ist, ist sie bei der Fraktion 4 nur von 30% bis 35% AS-Sättigung und bei der Fraktion 5 überhaupt nicht mehr zu sehen.

Die Lp(a)-Antigenität der Fraktion 4 muß der Lp(a)-Komplex sein, da oberhalb der Dichte 1,063 g/ml das LDL₂ alleine nicht mehr flotiert, diese Fraktion aber B-Aktivität aufweist.

Die Lp(a)-Aktivität in Fraktion 5 kann nicht zum Lp(a)-Komplex gehören, da hier keine B-Aktivität auftritt. In diesem Fall könnte es sich um nicht an LDL gebundene Lp(a)-Aktivität handeln, d.h. um freies Lp(a)-Antigen. Die unterschiedliche Verteilung der Lp(a)-Antigenität zwischen den Fraktion 4 und den Fraktion 1, 2 und 3 läßt sich wahrscheinlich als eine heterogene Population des Lp(a)-Komplexes interpretieren. Um die Existenz eines freien Lp(a)-Antigens im Serum beweisen zu können, wurden folgende Fraktionen immunologisch untersucht:

Fraktion 5.-Niederschläge 30% und 35% AS-Sättigung

" 4.- " 35% und 40% AS-Sättigung

" 3.- " 30% AS-Sättigung

" 2.- " 35% AS-Sättigung

Die Immunpräzipitate wurden dabei sowohl mit Proteinfarbstoff (Comassie BB, R-250) als auch mit Lipidfarbstoff (Sudan Schwarz B) gefärbt.

Abb. 3 und 4 zeigen die Immunpräzipitate der Fraktionen. Die Immunpräzipitate der Fraktion 5 lassen sich nur mit Proteinfarbstoff anfärben und nicht mit Lipidfarbstoff. Es kann sich somit nicht um den sonst zu findenden Lp(a)-Lipoproteinkomplex handeln, sondern nur um freies Lp(a)-Antigen.

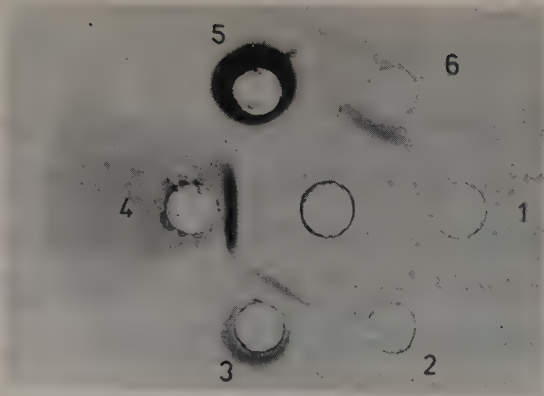


Abb. 3. Immundiffusion mit Färbung der Präzipitate auf Lipide mit Sudan Schwarz B. Mitte: Anti-Lp(a)-Serum. Loch 1: Fraktion 5 Ndlg. 30% AS-Sättigung. Loch 2: Fraktion 5 Ndlg 35% AS-Sättigung. Loch 3: Fraktion 3 Ndlg 30% AS-Sättigung. Loch 4: Fraktion 4 Ndlg. 35% AS-Sättigung. Loch 5: Fraktion 4 Ndlg. 40% AS-Sättigung. Loch 6: Fraktion 2 Ndlg. 35% AS-Sättigung.

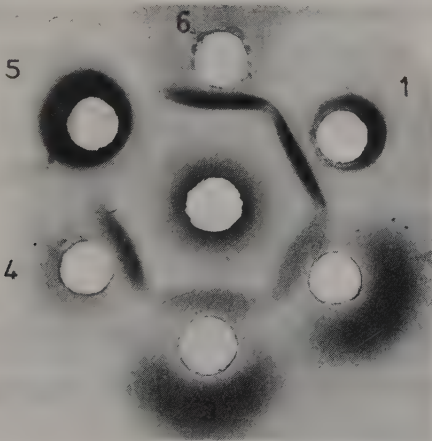


Abb. 4. Wie Abb. 3 aber Färbung mit Coomassie Blue R-250.

Lipoprotein A-Antigenität:

Diese Antigenität beginnt bei 35% AS-Sättigung in den Fraktionen 1, 2 und 3, bei 40% AS-Sättigung in Fraktion 4, bei 45% AS-Sättigung in Fraktion 5 und reicht in allen Fraktionen über 60% hinaus.

Lipoprotein C-Antigenität:

Sie beginnt in Fraktion 1 bei 35%, in Fraktion 2, 3 und 4 bei 40%, in Fraktion 5 bei 45% und geht in allen Fraktionen bis 60% AS-Sättigung.

Lipoprotein B-Antigenität:

Die ersten drei Fraktionen zeigen Antigenität von 20% bis 60% AS-Sättigung. Fraktion 4 nur bei 30% und 35% AS-Sättigung. Fraktion 5 weist überhaupt keine B-Antigenität mehr auf.

Betrachtet man die so erhaltene Antigenitätsverteilung und die jeweils an- bzw. abwesenden Lipoproteine der fünf untersuchten Dichtefraktionen, so erhält man die den Lipoproteinen zuzuordnenden Fällungsbe-
reiche.

In einigen Fällen mußten zur genauen Bestimmung des Anfangs- oder Endfällungsbereiches die durch Ultrazentrifugation gereinigten Lipoproteine ebenfalls gefällt werden.

Man erhielt folgende Fällungsbereiche für die einzelnen Lipoproteine:

Lp(a)-Lipoprotein 20% - 40% AS-Sättigung

VLDL	35% - 45%	"	"
LDL ₁	40% - 50%	"	"
LDL ₂	50% - 60%	"	"
HDL	55% - 70%	"	"

Eine Fraktionierung von Vollserum nach diesen Fällungsbereichen ist in Abb. 5 zu sehen.

Das Fehlen der erwarteten Bande des Lp(a)-Lipoproteinkomplexes in Gel Nr. 2, ist auf das Vorliegen eines Lp(a)-"negativen" Serums zurückzuführen.

Trotzdem kann man auch bei diesem Serum Lp(a)-Antigenität immunologisch zeigen (s. Abb.6).

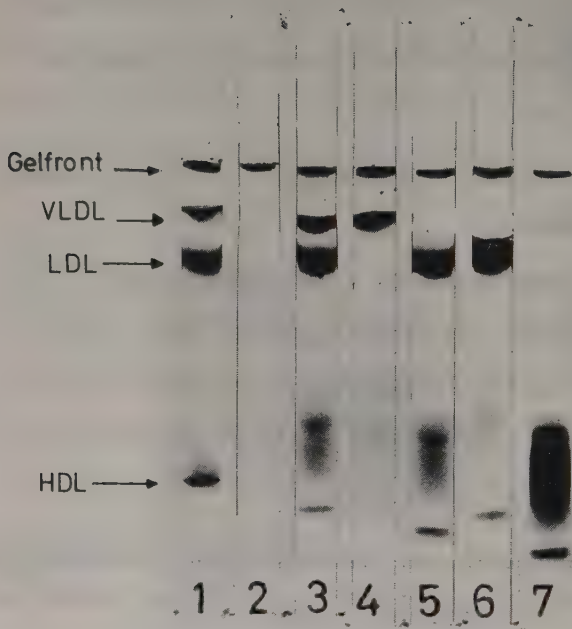


Abb.5. Disc-Elektrophorese (3,75% Gele) der mit Suddanschwarz vorgefärbten Fraktionen aus Lp(a)(-)-Serum. Nr. 1 Überstand 20% AS-Sättigung, Nr. 2 Niederschlag 20-35% AS-Sättigung, Nr. 3 Überstand 35% AS-Sättigung, Nr. 4 Niederschlag 35-50% AS-Sättigung, Nr. 5 Überstand 50% AS-Sättigung, Nr. 6 Niederschlag 50-60% AS-Sättigung, Nr. 7 Überstand 60% AS-Sättigung.

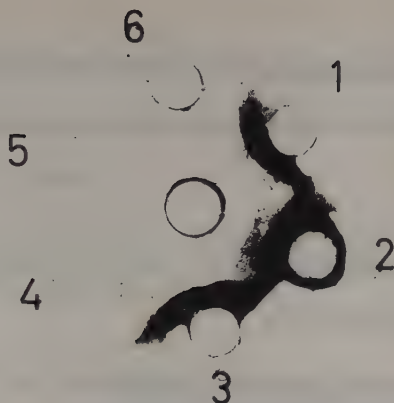


Abb. 6. Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (67)

Mitte: Lp(a)-Antiserum.

Loch 1. Fraktion 20-35% AS-Sättigung aus Lp(a)(+)-Serum

Loch 3. " " " " " " "

Loch 2. " " " " Lp(a)(-)-Serum

Loch 4. Niederschlag 20% AS-Sättigung " " " "

Loch 5. Niederschlag 40% AS-Sättigung " " " "

Loch 6. Überstand 40% AS-Sättigung " " " "

4.2. Darstellung und Charakterisierung der Lipo- proteine durch Phosphorwolframat

Die nach AS-Fällung erhaltenen Fraktionen wurden mit Natriumphosphorwolframat und wenn notwendig mit Hilfe von Gel-Chromatographie weiter gereinigt.

Zur Charakterisierung dienten Immunologie, Elektro-

phorese, Gel-Chromatographie, Affinitätschromatographie, analytische Ultrazentrifuge und Elektronenmikroskopie.

4.2.1. LDL Darstellung und Charakterisierung Phosphorwolframatfällung

Für die LDL Darstellung wurde die Fraktion 50-60% AS-Sättigung verwendet.

Bei einigen Versuchen auf Homogenität der Präparation wurde die Fraktion 50-55% AS-Sättigung bzw. 55-60% AS-Sättigung verwendet.

Sowohl Fraktionen aus Lp(a)-"positivem" als auch Lp(a)-"negativem" Serum wurden verarbeitet.

Der Reinigungseffekt der Fällung und der Waschprozedur ist an Hand der SDS-Elektrophorese zu sehen (s. Abb. 7). Aus den Ergebnissen ist zu sehen, daß die Waschprozedur (s. 25) unerläßlich ist, um eine einheitliche B-Bande zu erhalten.

Darüber hinaus wird deutlich, daß die Fällung des LDL mit Natriumphosphorwolframat quantitativ ist (Vgl. Abb. 7 Gel 2 und 3).

Die Chromatographie von LDL an Sepharose 4B ist in Abb. 8 gezeigt. Das Elutionsprofil zeigt die Homogenität der Präparation.

Die Verwendung von Lp(a) "positiven" bzw. "negativen" Serum führt zum gleichen Ergebnis.

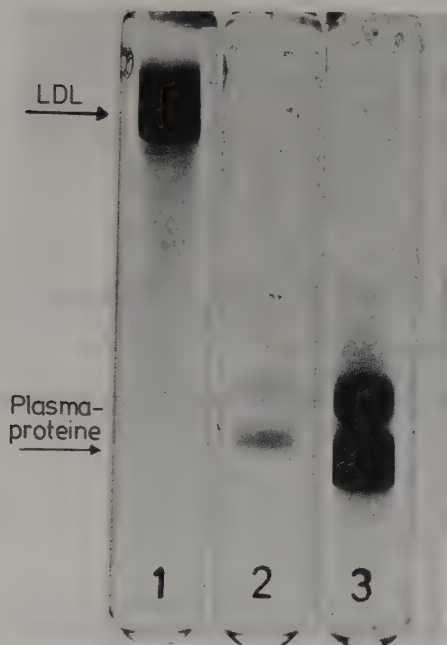


Abb. 7. SDS-Elektrophorese (3,75%) des gereinigten LDL. Gel 1 Niederschlag bei 0,05% Phosphorwolframat-

konzentration. Gel 2 Waschlösung. Gel 3 Überstand
nach Fällung mit Phosphorwolframat (0,05%).

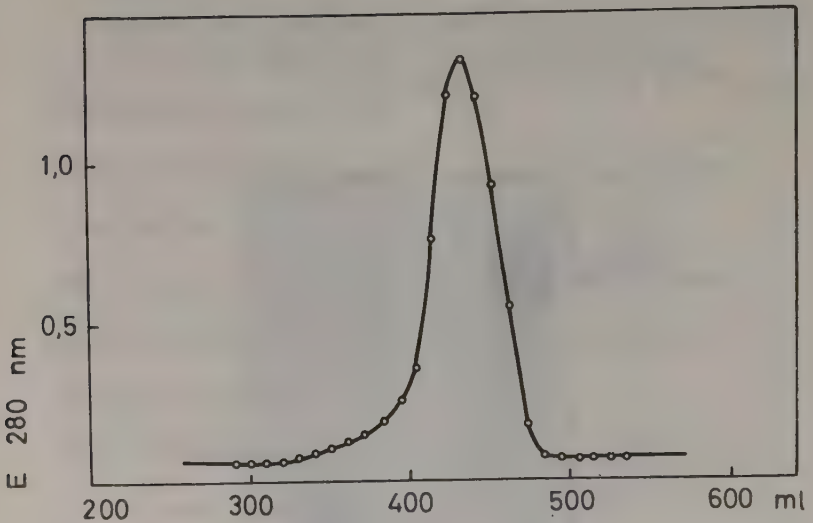


Abb. 8. Chromatographie an Sepharose 4B des durch
Phosphorwolframatfällung gereinigten LDL aus Lp(a)(+)
Serum. Elutionsmittel: 0,15 M NaCl, pH 7,5 (mit NaOH
eingestellt). Fraktionsvolumen: 5 ml. Die Proteinbes-
timmung erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm.

Das nach Ammoniumsulfat- und Phosphorwolframatfällung gereinigte LDL wurde immunologisch und mittels Elektronenmikroskopie untersucht.

Abb. 9 zeigt, daß das gegen Anti-Vollserum und Anti-B-Serum getestete LDL eine einzige Präzipitationslinie ergibt, was für die Reinheit der Präparation spricht.

Abb. 10 An Hand der zweidimensionalen Immunelektrophorese läßt sich ebenfalls die Homogenität des dargestellten LDL nachweisen.

Die Elektronenoptische Aufnahme der LDL zeigt Abb.11.

Wieder sieht man die Einheitlichkeit der Präparation, die mit der beschriebenen Methode erreicht wird.

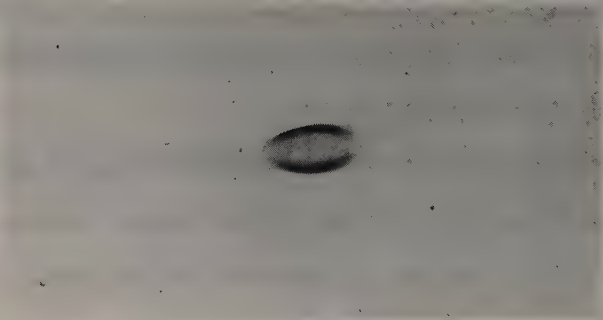


Abb. 9. Immunelectrophorese von LDL. Oberer Graben:

Anti-Vollserum. Unterer Graben: Anti-B-Serum.

Proteinfärbung mit Coomassie Blue R-250.

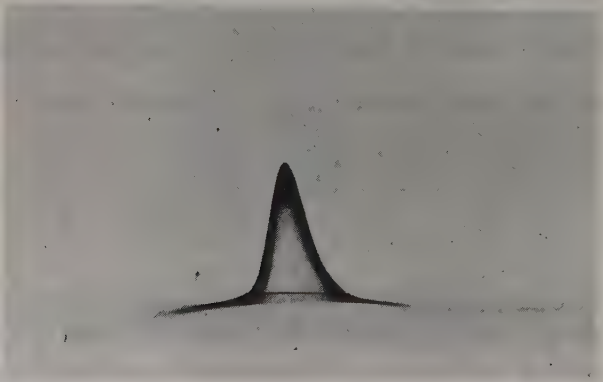


Abb. 10. Zweidimensionale Immunelectrophorese des

gereinigten LDL. Die Immundiffusion erfolgte gegen

Anti-B-Serum. Proteinfärbung mit Coomassie Blue R-250.

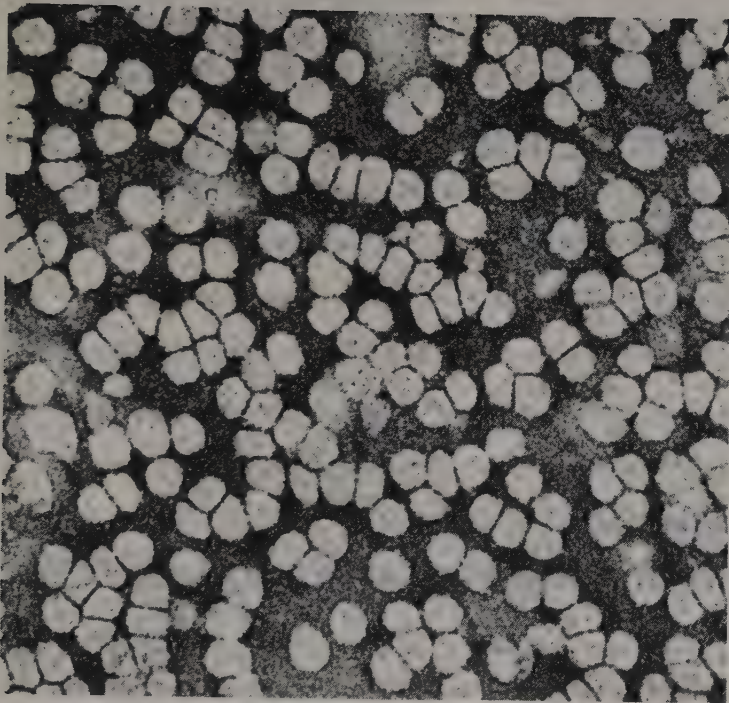


Abb. 11. Elektronenmikroskopische Aufnahme von LDL
Vergrößerung X 320 000. (Die elektronenmikroskopische
Untersuchung ist meiner Frau Malva Mejia de Garcia
zu verdanken).

4.2.2. Lp(a)-Darstellung und -Charakterisierung

Für die Darstellung dieses Lipoproteins wurden sowohl die Fraktion 20-40% AS-Sättigung als auch die Fraktion 20-35% AS-Sättigung verwendet.

a) Phosphorwolframatfällung

Die Fällung mit Phosphorwolframat wurde wie in experimentellen Teil beschrieben durchgeführt.

Die erhaltene Präparation wurde immunologisch und elektrophoretisch untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die nach Phosphorwolframatfällung dargestellte Lp(a)-Präparation noch mit VLDL verunreinigt war, da diese immunologisch gegen Anti-C-Serum positiv reagierte und elektrophoretisch VLDL nachgewiesen wurde.

Um diese VLDL-Verunreinigung zu entfernen, wurde die dargestellte Lp(a)-Fraktion mittels Chromatographie an Sepharose 4-B, Affinitätschromatographie an Con-A-Sepharose und Ultrazentrifugation weiter gereinigt.

b) Chromatographie an Sepharose 4-B

Durch Chromatographie an Sepharose 4-B konnte das Lp(a)-Lipoprotein von dem VLDL abgetrennt werden.

Abb. 12 zeigt die Elutionskurve.

Das Ergebnisse der immunologischen Untersuchung der erhaltenen Fraktionen ist in Tabelle V zusammengefaßt.

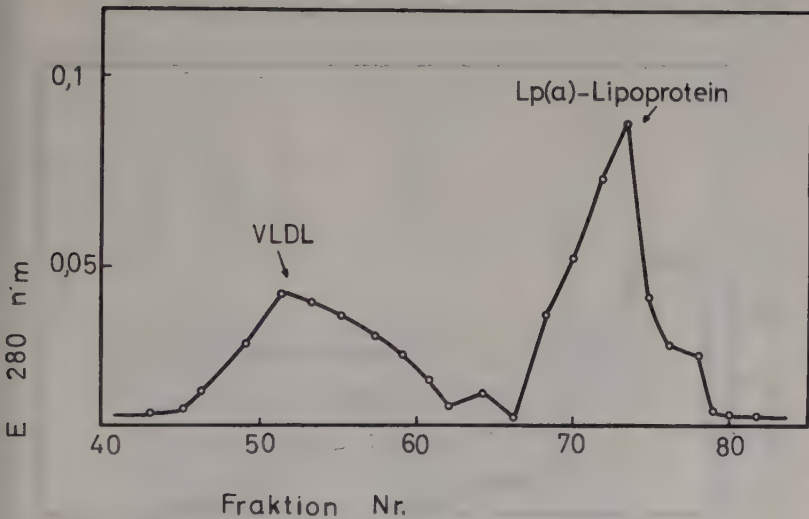


Abb. 12. Chromatographie der Lp(a)-Fraktion an Sepharose 4-B. Elutionsmittel: 0,15 M NaCl, pH 7,5 (mit NaOH eingestellt) Proteinbestimmung durch Messung der Absorption bei 280 nm.

c) Affinitätschromatographie an Con-A-Sephrose.

Die Chromatographie der verunreinigten Lp(a)-Fraktion (Abb.13) an Con-A-Sephrose lieferte widersprüchliche Ergebnisse. Bei einigen Präparationen gelang es, das VLDL vom Lp(a)-Lipoprotein zu trennen, bei anderen Präparationen wurde jedoch noch C-Apoprotein als Verunreinigung nachgewiesen, was auf eine Kontamination mit VLDL schließen läßt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle V zusammengefaßt.

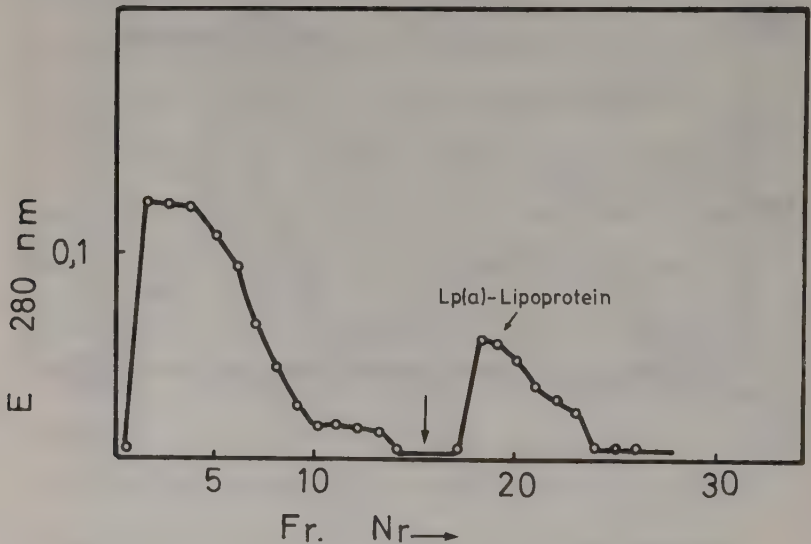


Abb.13. Affinitätschromatographie der Lp(a)-Fraktion an Con-A-Sephrose. Der Pfeil deutet die Zugabe des Puffers Nr.8 (Elutionspuffer) an. Die Proteine wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt.

Tabelle V

	Anti	Anti	Anti	Anti
	β	Ip(a)	C	Albumin
Peak der Fraktion 46-64 d. Sepharose 4-B Chromatographie d. Ip(a)-Fraktion. s. Abb. 12	+	-	+	-
Peak d. Fraktion 66-79 d. Sepharose 4-B Chromatographie d. Ip(a)-Fraktion s. Abb 12	+	+	-	-
Fraktion der Con-A-Sepharose-Chromatographie (adsorbierter Teil), Elution mit Puffer Nr. 8 s. Abb. 13	+	+	1x+	1x-
Unterstand d. Ultrazentrifugation der Ip(a)-Fraktion s. Text.	+	+	-	-
Ip(a)-Fraktion Ndlg. 0,05% nach Na-Ph-W-Behandlung s. Text.	+	+	+	-
Ip(a)-Fraktion Ü-0,05% nach Na-Ph-W-Behandlung s. Text.	-	+	+	+
Ip(a)-Fraktion des nicht an Con-A-adsorbierten Protein s. Abb. 13.	-	+	+	+

Immunologische Untersuchung der gereinigten Ip(a)-Fraktionen.
Die Doppeldiffusion erfolgte nach der Ouchterlony Methode (67).

d) Ultrazentrifugation

Die nach Phosphorwolframatfällung erhaltene Lp(a)-Fraktion wurde bei der Dichte des Puffers (1,006g/ml; s. Methoden) zentrifugiert (24 Std. bei 105 000 X g, 4°C).

Unter diesen Bedingungen ließ sich das VLDL von dem Lp(a)-Lipoprotein abtrennen.

Tabelle V zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der immunologischen Untersuchung.

e) Weitere Charakterisierung des Lp(a)-Lipoproteins

Die Charakterisierung des isolierten Lp(a)-Lipoproteins erfolgte immunologisch und elektrophoretisch nach den im Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Techniken.

Im Doppeldiffusionstest (Abb. 14) gegen verschiedene Antiseren zeigte das isolierte Lp(a)-Lipoprotein Immunpräzipitate nur gegen Anti-Lp(a)- und gegen Anti-B-Serum.

Die Immunelektrophorese sowohl gegen Anti-Vollserum als auch gegen Anti-B-Serum ließ in beiden Fällen nur

eine Präzipitationslinie erkennen (Abb. 15).

Die Ergebnisse deuten auf eine hohe Reinheit der Lp(a)-Präparation hin.

Diese Annahme wurde unterstützt durch das Ergebnis der Disk-Elektrophorese. Abb. 16 zeigt eine einheitliche Lp(a)-Bande in einem 3,75%-Gel, die, wie das Referenzgel zeigt, eine langsamere Wanderungsgeschwindigkeit als LDL aufweist. Lipidfärbung (Sudanschwarz) und Proteinfärbung (Coomassie Blue R-250) ließen keine nachweisbaren Verunreinigungen erkennen.

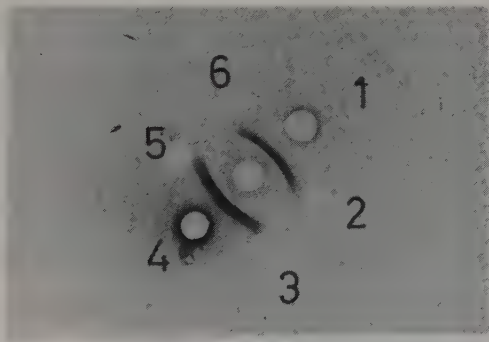


Abb. 14. Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (67) des gereinigten Lp(a)-Lipoproteins. Mitte: Lp(a)-Lipoprotein. Loch 1: Anti-B-Serum. Loch 2: Anti-AI-Apo-

protein. Loch 3: Anti-A-II-Apoprotein. Loch 4: Anti-Lp(a). Loch 5: Anti-C-Apoprotein. Loch 6: Anti-Albumin.

Abb. 15. Immunelektrophorese der gereinigten Lp(a)-Fraktion. Diffusion der Probe gegen Anti-Vollserum (oberer Graben) und gegen Anti-B-Serum (unterer Graben).



Abb. 16. Disk-Elektrophorese (3,75%) der mit Sudan-

schwarz vorgefärbten Lipoproteinfraktionen. Gel 1:LDL
(als Referenz). Gel 2:Gereinigte Lp(a).

4.2.3. HDL-Darstellung und Charakterisierung

Es wurde die Fraktion des Überstandes von 60% AS-Sättigung verwendet.

Die Fällung wurde bereits im experimentellen Teil beschrieben. Nach der Phosphorwolframatfällung wurde die gereinigte HDL-Fraktion immunologisch untersucht.

Die dabei erhaltenen Ergebnisse zeigten, daß die Präparation Albumin als Verunreinigung enthält. Diese Verunreinigung läßt sich durch mehrmaliges Waschen (s.experimenteller Teil) entfernen.

Die Homogenität der erhaltenen HDL-Präparation wurde durch chromatographie an Sepharose 4-B, Elektrophorese an Agarosegel, analytischer Ultrazentrifugation und Elektronenmikroskopie untersucht. Dabei wurden sich folgende Ergebnisse erhalten.

Die Chromatographie an Sepharose 4-B zeigt einen einzigen, weitgehend symmetrischen Peak, was auf eine

Homogenität der Präparation hindeutet (s. Abb. 17)

Das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese ist der Abb. 19 (Gel 5) zu entnehmen.

Analytische Ultrazentrifugation der HDL-Präparation ergab einen Sedimentationskoeffizienten ($S^{20,w}$) von 5,0 in Übereinstimmung mit in der Literatur angegebenen Werte (80).

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der gewonnenen HDL-Fraktion ließ eine weitgehende Homogenität der Präparation erkennen (Abb. 18).

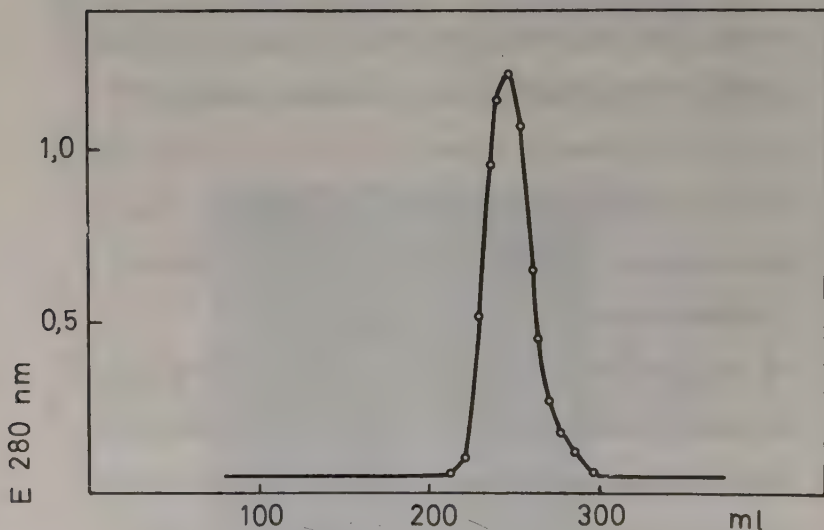


Abb. 17. Chromatographie an Sepharose 4-B der gereinigten HDL-Fraktion. Die Präparation wurde aus Lp(a) "negativem" Serum, wie im experimentellen Teil beschrieben

ben, gewonnen. Elutionsmittel: 0,15 M NaCl, pH 7,5 (mit NaOH eingestellt). Die Verfolgung des Proteins erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm.

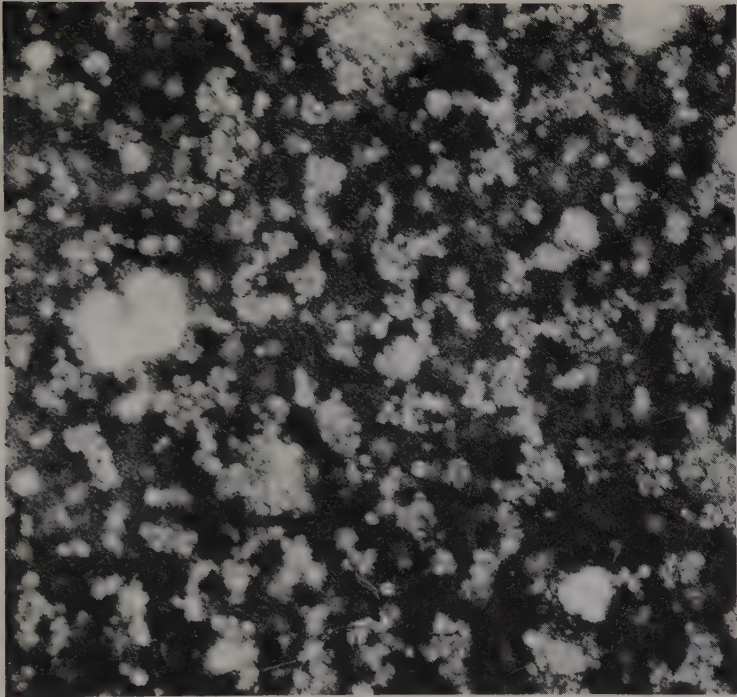


Abb. 18. Elektronenmikroskopische Aufnahme von HDL. Vergrößerung X 200.000. (Die elektronenmikroskopische Untersuchung ist meiner Frau Malva Mejia de Garcia zu verdanken).

4.2.4. VLDL - LDL₁

Für diese Lipoproteine wurde die Fraktion 35-50% AS-Sättigung genommen.

Entsprechend der obenbeschriebenen Methode (vgl. experimenteller Teil) wurden die Lipoproteine dieser Fraktion mit Phosphorwolframat ausgefällt.

Die erhaltene Lipoproteinfraction wurde mittels Agarosegelelektrophorese untersucht. Abb. 19 (Gel 1) zeigt, daß diese Fraktion eine ausgeprägte heterogenität aufweist. Daher wurde versucht, die einzelnen Komponenten durch Chromatographie an Sepharose 4-B aufzutrennen.

Die Chromatographie, wie das Elutionsprofil in Abb. 20 zeigt, brachte drei Fraktionen, die wiederum elektrophoretisch im Agarosegel untersucht wurden. Abb. 19 läßt erkennen, daß alle drei erhaltenen Fraktionen unterschiedliche elektrophoretische Mobilität besitzen. Peak 1 (Gel 2) zeigt zwei Komponenten, die Prä- β -Mobilität aufweisen. Peak 2 (Gel 3) erscheint aus einer Komponente zu bestehen, der eine Mobilität zukommt, die zwischen Prä- β und β liegt. Der dritte Peak (Gel 4) weist β Mobilität auf.

Als Vergleich diente das Ausgangsmaterial vor der Chromatographie (Gel 1) und eine gereinigte HDL-Fraktion (Gel 5).

Eine genaue Charakterisierung dieser Lipoprotein-

fraktionen muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Auf die heterogene Zusammensetzung wird in der Diskussion noch zurückzukommen sein.

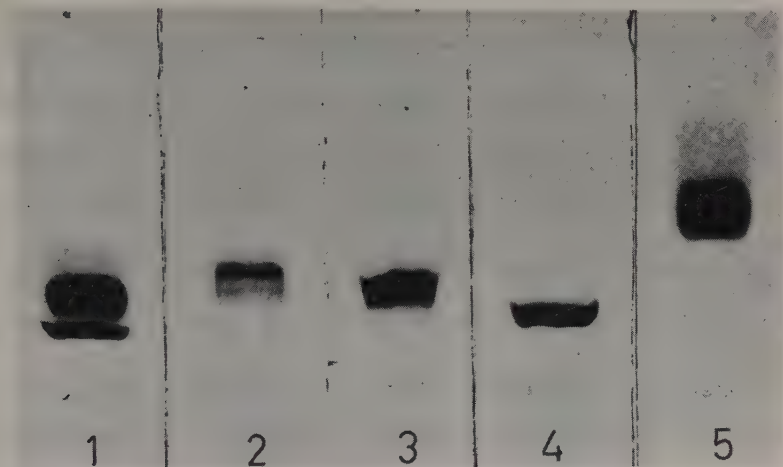


Abb. 19. Agarose-Gel-Elektrophorese nach Noble (75) (s. Material und Methoden). Gel 1: Lipoproteinniederschlag nach Phosphorwolframatfällung (0,05%) der Fraktion nach 35-50% AS-Sättigung. Gel 2: Peak 1 nach Chromatographie an Sepharose (vgl. Abb. 23). Gel 3: Peak 2

nach Chromatographie an Sepharose (vgl. Abb 23)

Gel 4: Peak 3 nach Chromatographie an Sepharose (vgl. Abb. 23). Gel 5: Gereinigte HDL-Fraktion. Färbung mit Sudanschwarz B.

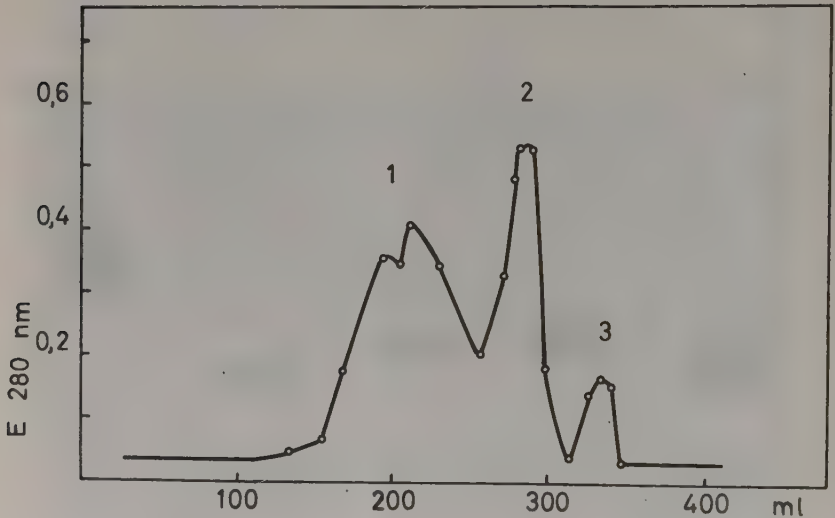


Abb. 20. Chromatographie an Sepharose 4-B der VLDL - LDL₁. Elutionsmittel: 0,15 M NaCl, pH 7,5 (mit NaOH eingestellt). Die Verfolgung des Proteins erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm.

4.3. Untersuchung über das Vorkommen von Lipoproteinen in atherosklerotischen Plaques.

Die Extraktion von atherosklerotischen Plaques wurde wie im experimentellen Teil beschrieben durchgeführt. Die Fällung des Extraktes geschah bei 40% AS-Sättigung. Sowohl der Rohextrakt als auch das Präzipitat und der Überstand nach der Fällung wurden immunologisch untersucht.

Im Dopeldiffusionstest (Abb. 21) gegen Anti-Lp(a) zeigt nur der Niederschlag von 40% AS-Sättigung ein Immunpräzipitat (Loch 4) der mit dem als Referenz getesteten Lp(a)-Lipoprotein (Loch 3 und 6) Identität aufweist.

Dagegen zeigt der Überstand der 40% AS-Sättigung (Loch 1) keine Immunreaktion mit dem Lp(a)-Antiserum.

Der Test gegen B-Antiserum ist in Abb. 22 zu sehen.

Hier zeigt nur der Überstand der 40% AS-Sättigung (Loch 3 und 5) eine Immunreaktion gegen das Antiserum.

Im gegensatz dazu hat der Niederschlag der 40% AS-Sättigung kein Immunpräzipitat (Loch 1).

Diese Ergebnisse deuten auf die Wirksamkeit der Trennung der Ammoniumsulfatfällung.

Um die Frage zu klären, ob die genannten Antigenitäten sowohl in der Media als auch in der Intima des pathologischen Gewebes zu finden sind, wurden Intima und Media getrennt und nach entsprechender Extraktion untersucht. Dabei wurde gefunden, daß sowohl die Lp(a)-Antigenität als auch die B-Antigenität in der Intima zu finden ist. Abb.23 a) und b) zeigen die Immundiffusion der untersuchten Proben gegen jeweils Anti-Lp(a)-Antiserum und B-Antiserum.

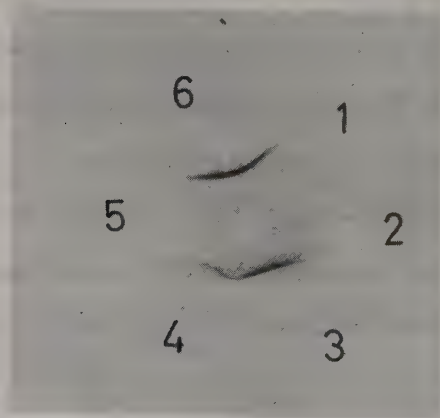


Abb. 21. Immundiffusionstest nach Ouchterlony (67)
Mitte: Lp(a)-Antiserum. Loch 1: Überstand 40% AS-

Sättigung. Loch 2: Leer. Loch 3: Lp(a) (Referenz).

Loch 4: Niederschlag 40% AS-Sättigung. Loch 5: **leer**.

Loch 6: Lp(a)(Referenz).

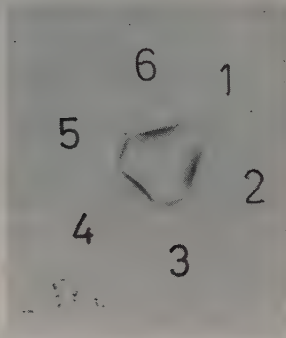


Abb. 22. Immundiffusion nach Ouchterlony (67).

Mitte: B-Antiserum. Loch 1: Niederschlag 40% AS-Sättigung. Loch 2: LDL (Referenz). Loch 3: Überstand 40% AS-Sättigung. Loch 4: Lp(a) (Referenz). Loch 5: Überstand 40% AS-Sättigung. Loch 6: LDL (Referenz).

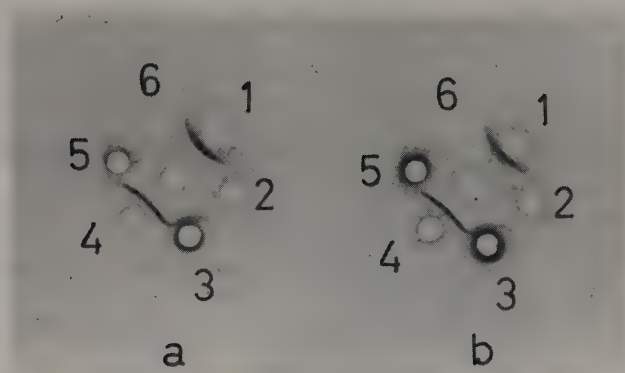


Abb. 23. a) und b). Immundiffusion nach Ouchterlony (67).

Platten a) und b)

Loch 1: Lp(a) (als Referenz)

Loch 2: Media (Rohextrakt)

Loch 3: Intima (Rohextrakt)

Loch 4: Lp(a) (als Referenz)

Loch 5: Media (Rohextrakt)

Loch 6: Leer

Platte a) Mitte: Anti-Lp(a)-Serum

Platte b) Mitte: Anti-B-Serum.

5. Diskussion.

Die bisherigen Methoden zur Serumlipoproteinfractionierung haben sich für bestimmte Probleme als nicht brauchbar gezeigt. So ist für die Diagnose bestimmter Lipidstoffwechselstörungen weder die Agarosegelelektrophorese noch die Ultrazentrifuge geeignet. Die Dichte der Lipoproteinklassen bei Hyperlipoproteinämien wird durch den veränderten Lipidgehalt dermaßen beeinflusst, daß diese Lipoproteine in ganz anderen Dichtebereichen als bei normalen Seren zu finden sind.

Die Fällungsmethoden zeigen außer den schon erwähnten ungenügenden Trennungen oft eine Veränderung der gefällten Lipoproteine durch das Fällungsmittel selber. Lediglich bei Phosphorwolframat bleibt dieser Effekt aus.

Kein einzelner Parameter wie das Verhalten bei Ultrazentrifugation, elektrophoretische Beweglichkeit oder immunologische Eigenschaften auf Grund der spezifischen Polypeptide, reicht allein aus, um ein einzelnes Lipoprotein vollständig zu charakterisieren und seine Reinheit festzustellen.

Bei der Fraktionierung der Lipoproteine durch Fällung

verwendeten Burstein et al. (62, 65) nur zwei Kriterien zur Reinheitsprüfung, nämlich die Agarosegelelektrophorese und immunochemische Methoden. Dabei ist zu beachten, daß die Agarosegelelektrophorese nicht in der Lage ist, zwischen LDL_1 und LDL_2 bzw. VLDL und Lp(a)-Lipoprotein zu unterscheiden. Außerdem sind die dabei erhaltenen immunologischen Ergebnissen in Zweifel zu ziehen, da erstens auch hier das Anti- β -Lipoproteinserum nicht zwischen den verschiedenen Lipoprotein-Berhaltenden Lipoproteinen differenzieren kann und zweitens die Reinheit seiner Fraktionen -beim Test gegen Anti-Vollserum- nicht allein durch Färbung auf Lipid gezeigt werden kann.

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Methode, die in der Lage ist -unter Berücksichtigung sämtlicher zur Verfügung stehenden Reinheitskriterien- das gesamte Lipoproteinspektrum des Humanserums zu erfassen. Dabei wurde vor allem dem Konzept der Lipoproteinfamilien nach Alaupovic (25) sowie dem Polymorphismus des LDL (Lp(a)-Lipoprotein) Rechnung getragen. Die Methode beruht auf einer Kombination zweier verschiedener Fällungen. Im ersten Schritt werden sämtliche Lipoproteine untereinander vorgetrennt. Die in diesen Lipoproteinfraktionen noch enthaltenden Plasma-

proteine können durch die spezifische Wirkung von Phosphorwolframat im zweiten Schritt entfernt werden.

Beide Fällungen basieren auf verschiedenen Wirkungsweisen. Ammoniumsulfat als Neutralsalz wirkt vermindernd auf die Wasseraktivität der Lösung unter Dehydratisierung der hydrophilen Gruppen von Proteinen. Dagegen wirkt Phosphorwolframat, indem es die elektrostatische Ladung einiger bestimmter Gruppen am Protein neutralisiert, deren Ionisation für die minimale Aufrechterhaltung der Hydrathülle des Proteinsmoleküls notwendig ist (82).

Um die Verteilung der gesamten Lipoproteine vollständig zu erfassen, wurde die Ammoniumsulfatfällung sowohl mit den Dichteklassen der Ultrazentrifuge als auch mit dem Konzept der Lipoproteinfamilien korreliert. Dies geschah mittels gereinigter Lipoproteine definierter Dichteklassen sowie Serum und Serumfraktionen, denen diese Dichteklassen fehlten.

Auf diese Weise ließen sich die optimalen Fällungsbereiche für die einzelnen Lipoproteine ermitteln. Die Fällung mit Ammoniumsulfat stellt eine der mildesten Methoden der Proteinreinigung dar.

Die nach der Ammoniumsulfatfällung immer noch verunreinigten aber untereinander getrennten Lipoproteine

werden durch die Fällung mit Phosphorwolframat von Begleitproteinen befreit.

Die Reinheit der erhaltenen Lipoproteine wurde mit mehreren Nachweisen bestätigt.

Im einzelnen erhält man folgende Lipoproteinverteilung:

HDL

Burstein et al (65) fanden bei ihrer alleinigen Anwendung von Phosphorwolframat als Fällungsmittel das HDL noch verunreinigt, in der Hauptsache mit γ -Globulin. Dieses Problem tritt bei dieser Methode nicht auf, da die γ -Globuline bereits bei der Ammoniumsulfatfällung entfernt werden.

Nach Abtrennung von Spuren Albumin bekommt man ein HDL, das immunologisch, elektrophoretisch sowie in der analytischen Ultrazentrifuge und im Elektronenmikroskop rein und homogen erscheint.

LDL

Im Gegensatz zur Ultrazentrifuge, wo das LDL sich über einen sehr breiten Dichtebereich erstreckt, liefert die hier beschriebene Fällungsmethode ein viel definiertes Lipoprotein. Alaupovic et al. (27) fanden bei der Untersuchung des LDL durch Subfraktionierung des gesamten Dichtebereiches dieses Lipoproteins, daß nur der obere Dichtebereich (1,035-

1,063 g/ml) Lipoprotein B als einzige Lipoproteinfamilie enthält, während das LDL des unteren Bereiches (1,019-1,035 g/ml) noch Lipoprotein A und C aufweist. Das gefällte LDL entspricht dem vorher genannten oberen Bereich und besteht nur aus Lipoprotein B.

Diese Befunde wurden elektrophoretisch und immunologisch bestätigt. Die Homogenität des erhaltenen Lipoproteins ist deutlich sichtbar in der Gelchromatographie und im Elektronenmikroskop.

Diese Ergebnisse unterstützen das Konzept der Lipoproteinfamilien als selbständige Einheiten, wie von Alaupovic und Kostner vorgeschlagen.

VLDL - LDL₁

In der Hauptsache entsteht LDL₂ aus dem Abbau von VLDL (34, 35). Der Prozess verläuft über Zwischenprodukte, -dem sogenannten "Intermediate" und dem LDL₁, wobei der Abbaumechanismus weitgehend ungeklärt ist. In Normalseren geschieht dieser Abbau ziemlich rasch, so daß die Menge an VLDL und LDL₁ minimal ist.

Um möglichst viel VLDL und LDL₁ isolieren zu können, mußte aus einem Serumpool gefällt werden.

Während man bei Verwendung von Normal-Serum eines einzigen Spenders VLDL und LDL₁ nur in sehr geringen Mengen nachweisen kann, zeigt das gepoolte Serum alle Stufen des VLDL Abbaues. Die drei Fraktionen der Gelchromatographie lassen sich gut den Banden der Aga-

rosegelelektrophorese zuordnen, und wurden als VLDL (Peak 1), "Intermediate" (Peak 2) und LDL₁ (Peak 3) identifiziert. Das gleichzeitige Vorhandensein aller drei Peaks ist nur in gepoolten Seren zu finden, wo verschiedenen lipämische Zustände existieren. Bei individuellen Seren wird jeweils nur der lipämische Zustand der Patienten wiedergespiegelt.

Lp(a)

Nach der Entdeckung des Lp(a)-Lipoproteins durch Berg (44) 1963 erschienen zahlreiche Arbeiten darüber. Heute jedoch arbeiten nur noch wenige Gruppen auf diesem Gebiet. Die Schwierigkeiten der Isolierung und die niedrigen Ausbeuten sind sicher mit ein Grund dafür. Utermann (56) und Ehnholm (55) verwendeten beide die Ultrazentrifugation mit anschließender Chromatographie (Hydroxyapatit bzw. Sepharose 4-B) zur Darstellung. Dabei ist der Nachteil, daß sich der Dichtebereich des Lp(a)-Lipoprotein (1,050 - 1,125 g/ml) sowohl mit dem des LDL als des HDL überschneidet. Für das Problem des Lp(a) erweist sich die hier beschriebene Methode als ganz besonders geeignet. Man erhält einen Lp(a)-Lipoproteinkomplex der, nur mehr durch ganz geringe Mengen von VLDL verunreinigt ist, welche sich sehr leicht abtrennen lassen.

Außer der hier auftretenden Lp(a)-Antigenität findet man eine zusätzliche Lp(a)-Antigenität ohne die sonst immer beobachtete B-Antigenität des Komplexes. Dieser Befund spricht für die Existenz eines freien Lp(a)-Antigens. Diese Tatsache ist überraschend und läßt völlig neue Betrachtungsweisen auf diesem Gebiet zu.

Das Vorhandensein von freiem Lp(a)-Antigen konnte während der weiteren Untersuchungen mehrfach bestätigt werden.

So fand man bei sogenannten Lp(a)-"negativen" Seren, deren Lp(a)-Lipoproteinkomplex in der Disk-Elektrophorese nicht mehr nachzuweisen war, die freie Antigenität sowohl in der Immundiffusion als auch in der Disk-Elektrophorese.

Testet man Lp(a)-"positives" Serum, dem durch Ultrazentrifugation alle Lipoproteine bis zur Dichte 1,125 g/ml entzogen wurden (Fraktion 5) -nach anschließender Fällung mit Ammoniumsulfat- mit Anti-Lp(a)-Serum, so erhält man ein Immunpräzipitat. Da bei einer Dichte größer als 1,125 g/ml kein Lp(a)-Lipoproteinkomplex mehr vorliegen kann, und das Immunpräzipitat sich nur mit Proteinfarbstoff, jedoch nicht mit Lipidfarbstoff anfärben läßt, muß es sich um freies Lp(a)-Antigen handeln.

Interessant ist, daß sowohl Lp(a)-Lipoprotein als auch freies Lp(a)-Antigen bei der Ammoniumsulfatfällung im gleichen Bereich ausfallen. Dagegen findet im zweiten Fällungsschritt mit Phosphorwolframat eine vollständige Trennung von Lp(a)-Komplex und freiem Lp(a)-Antigen statt. Das stellt eine ideale Möglichkeit dar, große Mengen von beiden Komponenten zu isolieren, um neben der näheren Charakterisierung das Zustandekommen, das Schicksal und die Funktion beider Moleküle im Lipoproteinstoffwechsel des Serums zu erforschen.

Eine zusätzliche Trennungsmöglichkeit des Lp(a)-Komplexes von Lp(a)-Antigen kann durch spezifische Adsorption des Lp(a)-Komplexes an Con-A-Sepharose erreicht werden, wobei der Komplex durch seinen LDL-Anteil gebunden wird.

Bei der Entstehung von Atherosklerose scheint LDL eine gewisse Rolle zu spielen (79). Walton et al (69) diskutieren sogar die Beteiligung von Lp(a)-Lipoprotein. Durch Immunfluoreszenztechniken an Schnitten von atherosklerotischen Plaques fanden sie sowohl LDL- als auch Lp(a)-Antigenität. Die von ihnen erhaltenen sehr ähnlichen Verteilungsmuster führten sie zu der Annahme, es handle sich hier um den Lp(a)-Lipo-

proteinkomplex.

Um die generelle Anwendbarkeit der hier beschriebenen Methode unter Beweis zu stellen, wurde versucht, den von Walton postulierten Lp(a)-Lipoproteinkomplex aus atherosklerotischen Plaques zu extrahieren. Dabei wurde nicht nur die Brauchbarkeit dieser Methode sichtbar, man erhielt darüber hinaus ein überraschendes Resultat. Die Lp(a)-Antigenität in diesen Plaques stammt nicht aus einem Lp(a)-Lipoproteinkomplex, sondern ist ausschließlich freies Lp(a)-Antigen. Dieser Befund hätte sich mit den bisher bekannten Methoden nicht zeigen lassen können.

Weitere Untersuchungen dienten der genauen Lokalisation des LDL und des freien Lp(a)-Antigens in den verschiedenen Schichten der Plaques. Beide sitzen in der innersten Schicht, d.h. in der intima.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die vorliegende Methode sich aus mehreren Gründen hervorragend für die Lipoproteinforschung eignet:

Erfassung des gesamten Spektrums der Lipoproteine,

Anwendung in der Klinik bei Diagnose von Lipidstoffwechselstörungen (Lipoproteinämien) sowie Speicher-

krankheiten (Atherosklerose),

Verfolgung von Biosynthese und Metabolismus der einzelnen Lipoproteine,

Erforschung des Polymorphismus bei Lipoproteinen

und Anwendbarkeit auch bei Problemen, die bisher wegen zu kleiner Substanzmengen nicht lösbar erschienen.

6. Zusammenfassung

Es wurde eine Methode zur analytischen und präparativen Darstellung der Lipoproteine aus menschlichem Serum entwickelt.

Die neue Darstellungsweise von sämtlichen Serumlipoproteinen besteht in einer Kombination fraktionierter Ammoniumsulfatfällungen und Reinigungsschritten durch Präzipitation mit Phosphorwolframat.

Unter Anwendung der ausgearbeiteten Methode ist es nunmehr möglich, Lipoproteine nach anderen Parametern als denen ihrer Dichte zu trennen.

Analytische Beispiele wie die Bestimmung der Lipoproteine in atherosklerotischen Läsionen wurden gezeigt.

Die Methode erlaubt ferner die präparative Gewinnung der einzelnen Lipoproteine.

Die Untersuchungen auf Lp(a)-Lipoprotein führten zur Entdeckung der Existenz von freiem Lp(a)-Antigen.

Sowohl aus dem Serum Lp(a)-"positiver" wie auch "negativer" Spender konnte Lp(a)-Antigenität nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis

1. Vladimir P. Skipski in "Blood Lipids and Lipoproteins" 471-583 Ed. Gary Nelson 1972
Wiley Intersc. N.Y.
2. Winzler R. J. Glycoproteins in "Plasma Lipoproteins" Vol. I 309 p, 1960. Ed. F.M. Putnam,
Acad. Press. N.Y.
3. Bilheimer D.S., Eisenberg S., Levy R.I.
J. Clin. Invest. 50 (1971) 8a
4. Scanu A., Cump E., Toht J., Koga S., Stiller E.,
Albers L. Biochemistry 9 (1970) 1327-1335
5. Scanu A.M. Science 153 (1966) 640
6. La Rosa J.C., Levy R.I., Hebert P., Lux E.E.,
Fredrickson D.S. Biochem. Biophys. Res. Commun.
41 (1970) 57-62
7. Kook A.I., Rubinstein D. Biochim. Biophys. Acta
202 (1963) 518-528
8. Zilversmit D.B. J. Lipid Res. 12 (1971) 36-42
9. Lees R.S. and Hatch F.T. J. Lab. Clin. Med.
61 (1963) 518-528
10. Kahlke W., Rapp W. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.
73 (1967) 828-831
11. Lindgren F.T., Elliot H.A., Gofman J.W.
J. Phys. and Coll. Chem. 55(1951)80-93
12. Gofman J.W., Lindgren F.T., Elliot H.A., Mantz W.

- Hewitt J., Strisower., Herring V.
Science 111(1951)166-171 und 186
- 13.. Walton K.W. in "Die Lipoproteine des Blutes"
Wiss. Veröff. Dtsch. Ges. Ernähr. 23 (Hg. H.
Ditschuneit) Steinkopf, Darmstadt 1973 S. 47-55
14. Schumaker V.N., Adams G.H. Ann. Rev. Biochem.
38 (1969) 113
15. Oncley J.L. in "Brainlipids and Lipoproteins
and Leucodystrophies" S. 1-17. Eds. J. Folch-
Pi, Elsevier, Amsterdam 1963
16. Mascheboeuf M. Bull. Soc. Chim. Biol.
11 (1929) 268
17. Blix G., Tiselius A., Svensson H. J. Biol. Chem.
137 (1941) 485
18. Pedersen K.O., J. Phys. and Coll. Chem.
51 (1947) 156
19. Pedersen K.O. "Ultrazentrifugal Studies on Serum
and Serum Fractions" (Almquist and Wiksells,
Uppsala, 1945)
20. Gofman J.W., Lindgren F.T., Elliot H.A.
J. Biol. Chem. 179 (1949) 973
21. De Lalla O.F., Gofman J.W. Methods Biochem.
Anal. 1 (1954) 459
22. Lindgren F.T., Nichols A.V. in "The Plasma
Proteins" Vol. II Seite 1 (Ed. F.W. Putnam)
Acad. Press. N.Y. 1960

23. Alaupovic P. Protides Biol Fluids 19(1972)9
24. Alaupovic P., Gustavson A., Sanbar S.S., Furman R.H.; Circulation 30 Suppl. III 1 (1964)
25. Alaupovic P. Atherosclerosis 13(1971)141-146
26. Kostner G., Alaupovic P. Biochem. 11(1972)3419
27. D.M. Lee., Alaupovic P. Biochem. 9 (1970) 2244
28. Edelstein C., Lim C.T., Scanu A.M.
J. Biol. Chem. 147 (1972) 5842
29. Brown W.V., Levy R.I., Fredrickson D.S.
J. Biol. Chem. 244 (1969) 5687
30. Brown W.V., Levy R.I., Fredrickson D.S.
J. Biol. Chem. 245 (1970) 6588
31. Scanu A.M. J. Lipid Res. 7 (1966) 295
32. Shore V., Shore B. Biochemistry 6 (1967) 1962
33. Shore V., Shore B. Biochem. Biophys. Res.
Commun. 9 (1962) 455
34. Rubinstein B., Rubinstein D. J. Lipid Res.
13 (1972) 317-324
35. Eisenberg S., Windmueller H.G., Levy R.I.
J. Lipid Res. 14 (1973) 446-458
36. Shore B. Arch. Biochem. Biophys. 71(1958) 1
37. Ayrault-Jarrier M., Cheftel R.I., Polonovski J.
Bull. Soc. Chim. Biol. 43 (1961) 811
38. Bilheimer D.W., Eisenberg S., Levy R.I.
Biochem. Biophys. Acta 260 (1972) 212-221

39. Eisenberg S., Bilheimer D.W. Levy R.I. Lindgren F.T. Biochem. Biophys. Acta 326(1973)361
40. Brown W.V., Levy R.I., Fredrickson D.S. Fed. Proc. 29 (1970) 327
41. Seidel D., Alaupovic P., Furman R.H., McConatly W.J. J. Clin Invest. 49 (1970) 12
42. Fredrickson D.S., Gotto A.M., Levy R.I. in: "The Metabolic Basis of inherited Disease" S. 493. Ed. J.B. Stanbury Mc Graw-Hill USA 1972
43. Klör H., H. Dischuneit, L. Mico, in "Die Lipoprotein des Blutes" Wiss. Veröff. Dtsch. Ges. Ernähr. 23 (Hg. H. Dischuneit) Steinkopf Vlg. Darmstadt 1973 S. 56-61
44. Berg K. Acta path. microbiol. Scand. 59 (1963) 369
45. Berg K. Vox Sang. 11 (1966) 419
46. Harvie N.R., Schultz J.S. Proc. Nat. Acad. Science USA 66 (1970) 99-103
47. Utermann G., Wiegandt H. Humangenetik 11(1970)66
48. Rittner Ch., Wichman D. Humangenetik 5(1967)42
49. Ehnholm Ch., Garoff H., Simons K., Aro H. Biophim. Biophys. Acta. 236 (1971) 431
50. Uterman G., Wiegandt H. Humangenetik 8(1969)39
51. Simons K., Ehnholm Ch., Renkonen O., Sloth R. Acta pathol. microbiol. Scand. Sect.B 78(1970)459

52. Vogelberg K.H., Uterman G., Gries F.A.
Z. Klin. Chem. Biochem. 11 (1973) 291-296
53. Rider A.R., Levy R.I., Fredrickson D.S.
Circulation 40 + 41 Supl. 3 (1970) 34
54. Wiegandt H., Lipp K., Wendt G.G. Hoppe-Seyler's
Z. Physiol. Chem. 349 (1968) 489
55. Ehnholm Ch., Garoff H., Renkonen D., Simons K.
Biochemistry 11 (1972) 3229
56. Utermann G., Lipp K., Wiegandt H.
Humangenetik 14 (1972) 142
57. Seidel D., Geisen H.P., Roelke D. FEBS Letters
14 (1972) 142
58. Jürgens G., Kostner G. Immunogenetics 1(1975)560
59. Scanu A.M., Granda J.L. Biochem. 5(1966)446
60. Burstein M., Praverman A. Compt. Rend. 245(1957)
2588
61. Walton K.W., Scott P.J. J.Clin. Invest.
17 (1964) 627
62. Burstein M., Samaille J. Clin.-Chim. Acta
3 (1958) 320
63. Burstein M., Scholnik H.R. Life Sci. 11, Part.
II (1972) 177-184
64. Burstein M., Morfin R. Life Sci. 8, Part. II
(1969) 345-348
65. Burstein M., Scholnik H.R., Morfin R.
J. Lipid Res. 11 (1970) 583-595

66. Cornwell D.G., Kruger F.A. J. Lipid Res. 2(1961)110
67. Ouchterlony Ö. Progr. Allergy 5(1958)1-78
68. Vogelberg K.A., Utermann G., Gries F.A.
Z. Klin. Chem. 7 (1973) 291
69. Walton K.W. Hitchens J., Magnani H.N., Khan M.
Atherosklerosis 20 (1974) 323-346
70. Lee D.M., Alaupovic P. Biochem. J. 137 (1974)155
71. Havel R.J., Howard E.E., Bragdon J.H.
J. Clin Invest. 34 (1955) 1345
72. Maurer R.H. in "Disc-Electrophoresis and related
Techniques" S. 44 Walter Gruyter. Berlin-N.Y. 1971
73. Mc Donald H.J. Ribeiro L.P. Clin. Chim. Acta
4 (1959) 458
74. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem. 244(1969)4406
75. Noble R.P. J. Lipid Res. 9 (1968) 693
76. Scheideger J.J. Int. Arch. Allergy 7 (1955) 105
77. Laurell C.B. Anal. Biochem. 10 (1965) 358
78. Clarke M. Hg. and Freeman T. Clin. Sci.
35 (1968) 403
79. Srinivasan S.R., Dolan P., Radhakrisnamurphy B.,
Pargaonkar P.S. Biochem. Biophys. Acta
338 (1975) 58-70
80. Shore B. Arch. Biochem. Biophys. 71(1957)1-10
81. Keil-Sormova in "Laboratoriumstechnik für Bio-
chemiker" Akad.Vlg. Geest & Portig K.G.
Leipzig 1965. S. 425
82. H.E. Schultze., in "Molecular Biology of Human
Proteins" Vol.I. S.240. Elsevier.Amsterdam 1966

8. Verzeichnis der Abkürzungen

Å	Ångström (1 Å = 10^{10} m = 0,1 nm)
Anti-A-I	Anti-Apoprotein-A-I-Serum
Anti-A-II	Anti-Apoprotein-A-II-Serum
Anti-B	Anti-B-Serum
Anti-C	Anti-Apoprotein-C-Serum
Anti-Lp(a)	Anti-Lp(a)-Antigen-Serum
AS	Ammoniumsulfat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
HDL	High density lipoprotein
KV	Kilovolt
LDL	Low density lipoprotein
Lp(a)(+)	Lp(a)-"positiven"
Lp(a)(-)	Lp(a)-"negativen"
Na-Ph-W	Natriumphosphorwolframat
Ndlg.	Niederschlag
nm	Nanometer
P-Lipide	Phospholipide
SDS	Sodium-dodecyl-sulfat
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UZ	Ultrazentrifuge
Ü	Überstand
VLDL	Very low density lipoprotein

Lebenslauf

15. 2. 1939 geboren in Córdoba als 3. Kind des Manuel García S. und seiner Ehefrau Isabel Parra R. de García.
- 1945 - 1949 Besuch der kath. Schule in Córdoba
- 1949 - 1956 Besuch des Instituto Nacional de Enseñanza Media de Córdoba y Osuna
11. 4. 1957 Reifeprüfung
- 1968 - 1973 Studium der Chemie an der Humboldt-Universität zu Berlin
31. 7. 1973 Staatsexamen zur Erlangung des Diplomchemikers
- 1973 - 1974 Forschungsauftrag am Institut für Physiologische und Biologische Chemie der Humboldt Universität zu Berlin
1. 9. 1974 Beginn der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. P. Karlson in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Wiegandt.

Veröffentlichungen

- 1974 T. Schewe; Ch. Hiebsch; M. García Parra und S.M. Rapoport. "Zur Wirkung von Atmungshemmstoffen auf die Atmungsenzyme der Mitochondrien aus Blumenkohl". Acta Biol.Med. Germ. 32 (1974) 419
- 1975 M. García Parra; T.Schewe und S.M. Rapoport "On the presence of a calcium-stimulated phospholipase A in the stroma-free supernatant fluid of rabbit reticulocytes" Acta Biol. Med. Germ 34 (1975) 1075
- 1976 M.García Parra; M.Mejía de García; H.Wiegandt "On the isolation of Lp(a)-Lipoprotein without ultrazentrifugation""19th International Conference on the Biochemistry of Lipids". Paris.Sept. 1976 1.B.1.

